

纤连蛋白在血管钙化过程中作用机制的研究

丁海涛

作者单位:010017 呼和浩特市,内蒙古自治区医院检验科

【摘要】 目的 探讨纤连蛋白(fibronectin, Fn)在血管钙化过程中是否通过细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)信号传导通路促进平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)向成骨样细胞分化从而促进血管钙化。**方法** 构建 β -磷酸甘油(β -glycerophosphate, β -GP)体外诱导血管 SMC 钙化模型。采用 RT-PCR 检测成骨细胞特异性转录因子——核结合因子 a1(core binding factor a1, Cbfa1)、骨钙素(osteocalcin, OC)和 ALP 的 mRNA 水平;免疫印迹法检测 ERK 以及 Cbfa1、平滑肌 α 肌动蛋白(smooth muscle α actin, SM- α -actin)和平滑肌 22 alpha(smooth muscle 22 alpha, SM22 α)的蛋白表达。**结果** Fn 促进了 SMC 的表型转化;促进了与成骨样分化相关的标志物的表达,包括:ALP、OC;上调了成骨样分化中起关键作用的转录因子 Cbfa-1 的表达;下调了 SMC 原有标志蛋白 SM- α -actin 和 SM22 α ;激活了 ERK-MAPK 信号传导通路,用 ERK 通路抑制剂后,ALP、钙沉积、Cbfa-1、和 OC 的表达下调;整合素 β 1 受体阻断实验显示,阻断 β 1 使 ALP 活性和钙沉积的量均下降。**结论** 结果表明,Fn 通过 ERK 信号传导通路促进血管 SMC 成骨样分化从而促进血管钙化。

【关键词】 纤连蛋白类;肌,平滑,血管;信号传导

The research of the regutyory role of fibrone in the process of vascular calcification

DING Hai-tao. Department of laboratory, Inner Mongolia Autonomous Region Hospital, Hohhot 010017, China

【Abstract】 Objective To investigate if regulatory role of fibronectin (Fn) promotes vascular smooth muscle cell (SMC) to differentiate into osteoblastic-like cell, therefore promote vascular calcification via the extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway in the process of vascular calcification. **Methods** Beta-glycerophosphate (β -GP) vitro induced vascular calcification model was constructed. The levels of osteoblast-specific transcription factor —— core binding factor a1 (Cbfa1), osteocalcin (OC) and alkaline phosphatase's (ALP) mRNA were detected by RT-PCR technology. Western Blot was utilized to examine protein expression of extracellular signal-regulated kinase (ERK), Cbfa1, vascular smooth muscle α actin (SM- α -actin) and vascular smooth muscle 22 alpha (SM-22 α). **Results** Fn enhanced the phenotypic conversion of SMC. Fn promoted expression of osteoblastic associated markers, including ALP, OC. Fn increased the expression of transcription factor Cbfa1 that was essential for osteoblast-like differentiation. Fn reduced the activity of original SMC marker protein SM- α -actin and SM 22 α . Fn activated the ERK-MAPK signal transduction pathway, the expression of ALP, calcium deposition, Cbfa1 and OC lowered after using ERK pathway inhibitor. Integrin β 1 blocker experiments showed that blocking β 1 made ALP activity and the level of calcium deposition declined. **Conclusion** These findings seem to suggest that Fn enhanced vascular calcification by promoting the osteoblastic differentiation of vascular SMC via ERK signal transduction pathway.

【Key words】 Fibronectins; Muscle, smooth,vascular; Signal transduction

平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)是构成血管结构维持血管功能的主要细胞,在血管发生钙化的过程中,尽管内皮细胞、巨噬细胞等细胞均参与病变,但 SMC 在介导病变中发挥主要作用。在以往的关于血管钙化机制的研究中,研究者也多以 SMC 作为研究对象。SMC 在各种致病因素的作用下发生成骨样分化从而调节血管钙化是越来越多的研究者的

共识。纤连蛋白(fibronectin, Fn)作为血浆及基质蛋白的重要组份,其在钙化中的作用也逐渐受到重视。尽管这方面的研究还不多,但随着血管钙化与骨形成关系研究的进一步深入,作为骨形成中关键调节蛋白 Fn 在血管中的作用成为更多研究者研究的焦点。 β -磷酸甘油(β -glycerophosphate, β -GP)体外诱导血管 SMC 钙化模型是研究血管钙化机制的常用

细胞模型。正常情况下,在诱导第 14 天会出现钙化结节。本研究应用了 β -GP 诱导的体外钙化细胞模型,从 Fn 对血管 SMC 体外钙化的影响入手,试图阐述 Fn 影响 SMC 体外钙化的机制及相关细胞信号传导通路。

1 材料与方法

1.1 试剂和材料 DMEM 细胞培养基、胰蛋白酶和 I 型胶原酶购自美国 Gibco BRL 公司;胎牛血清(FBS)、硝酸纤维素膜购自美国 Hyclone 公司; β -甘油磷酸钠、ALP 试剂盒购自美国 Sigma 公司;PD98059、U0126 购自美国 CST 公司;鼠抗磷酸化细胞外信号调节激酶(phosphorylated extracellular signal-regulated protein kinase, pERK)及 ALP 标记山羊抗小鼠 IgG 购自美国 Santa Cruz 公司;Anti-integrin β 购自 Merk-Calbiochem;逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒购自宝生物公司;其余试剂均为国产分析纯。所有塑料器皿(培养瓶,培养板,培养皿)均购自 Corning-Costar 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养皿的处理 将浓度为 1 mg/ml 的 Fn 用 PBS 液稀释,计算初始浓度,将其置于 6 cm² 的培养皿中,使其均匀覆盖皿底,并放于细胞培养箱中 24 h,取出后测量未贴附的 Fn 浓度,(初始浓度-未贴附的浓度)/6 即为单位底面积的 Fn 的浓度,依此方法使之产生 5~30 μ g/cm² 的系列浓度用于实验^[1]。

1.2.2 细胞培养与体外诱导钙化 选用体重 150 g 左右的雄性 SD 大鼠(购自北京大学实验动物科学部)经引颈处死,用胶原酶消化法分离原代大鼠胸腔主动脉 SMC,实验用细胞为 3~8 代。传代细胞接种于 Fn 覆盖的培养皿内,待细胞融合生长后换用钙化培养液(含 15% FBS、100 U/ml 青霉素和 100 g/ml 链霉素,另补充 10 mmol/L β -甘油磷酸钠),继续培养 12 d(有特别指定除外),每 3 d 换液 1 次。实验操作步骤严格按操作说明进行。

1.2.3 钙结节茜素红(Alizarin Red S)染色 钙化 SMC 用 PBS 洗 3 次后,用新鲜配制的 4%中性甲醛于室温固定 45 min,吸去固定液,蒸馏水洗 3 次,每次 5 min。加入 2% Alizarin Red S 溶液 5 min,镜下观察、照相,红色和桔红色的结节是钙化结节。

1.2.4 基质钙沉积测定 通过测定基质中的钙沉积来定量钙化程度。按上述处理钙化 SMC 指定时间后,用 PBS 洗 3 次,再用 0.6 mol/L HCl 脱钙 24 h。收集 HCl 溶液,离心取上清用原子吸收光谱(AAS)测定钙含量。剩下的细胞用 PBS 洗 3 次,0.1 mol/L

NaOH/0.1% SDS 裂解细胞,用 Lowry 法测细胞裂解液中蛋白质含量。钙沉积量按蛋白质质量归一化。

1.2.5 ALP 活性测定 ALP 活性测定采用文献^[1]方法测定。按上述处理钙化 SMC 指定时间后,用 PBS 洗 3 次,再用 1% Triton X-100 / 0.9% NaCl 4℃裂解细胞 1 h。离心取 200 μ l 上清液,加入到 37℃的 1 ml 反应混合液(碱性缓冲液和反应底物各 0.5 ml)中,在 37℃反应 30 min。加入 12 μ l 1 mol/L NaOH 终止反应,然后测定 405 nm 的吸光度。以对硝基苯酚为标准物作标准曲线算得 ALP 活性。采用 Lowry 法测细胞裂解液中蛋白质含量,ALP 活性按蛋白质质量归一化。

1.2.6 蛋白免疫印迹 用蛋白免疫印迹法检测 Fn 对 SMC 中细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)磷酸化的影响,以及成骨细胞特异性转录因子——核结合因子 a1 (core binding factor a1, Cbfa1)、SMC 原有的标志性蛋白平滑肌 α 肌动蛋白(smooth muscle α actin, SM- α -actin)和平滑肌 22 alpha(smooth muscle 22 alpha, SM22 α)。

1.2.7 SMC 总 RNA 的提取 细胞总 RNA 的提取主要按 Gibco 公司提供的 trizol 法进行。测量 1:100 稀释的样品的 OD 260 来计算浓度,同时测量稀释样品的 OD 280,根据 OD 260/OD 280 估计 RNA 的纯度。RNA 纯品 OD 260/OD 280 值为 1.8,如果样品比值过低,表明有蛋白质或酚污染。

RNA 浓度 (μ g/ml)=[(稀释度)×(40 μ g/ml OD 260)]×(样品的 OD 260)

1.2.8 实时荧光定量 PCR(real time-PCR)分析 作为成骨分化标志的 Cbfa1、骨钙素(osteocalcin, OC)和 ALP 的 mRNA 水平通过 RT-PCR 来测定。

1.2.9 整合素抗体阻断实验 Anti-integrin β 1 的使用浓度为 1 μ g/ml,从培养细胞第 3 天(换用钙化培养基)时开始加入,每隔 3 d 补充加入 1 次,共加入 3 次,于钙化的 12 d 测定 ALP 活性和钙沉积量。

1.3 统计学处理 显示结果为至少 3 次重复实验中的 1 次。组间比较采用双侧 *t* 检验及单因素方差分析,*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Fn 促进血管 SMC 钙化结节的形成及钙化数量 经 Alizarin Red S 染色可见:对照组仍呈现 SMC 经典的“丛、岭”样分布,并未见钙化结节出现(图 1A)。在 β -GP 诱导钙化第 11 天 Fn 组已可见明显钙化结节(图 1B)。同样条件下两组钙化结节数量的比较有统计学意义(*P* < 0.05,图 1C)。通过测定基质

钙沉积来定量 SMC 的钙化程度,如图 2A、2B 所示: Fn 组无论从剂量依赖性还是时间依赖性,都明显促进钙化。

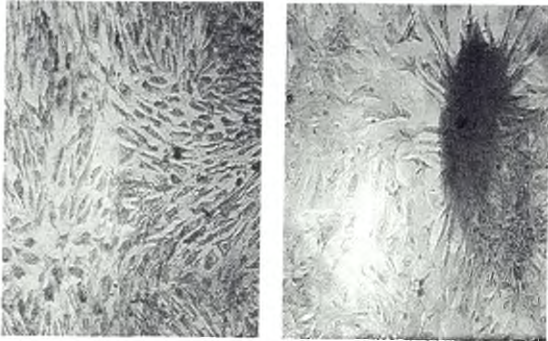


图 1A

图 1B

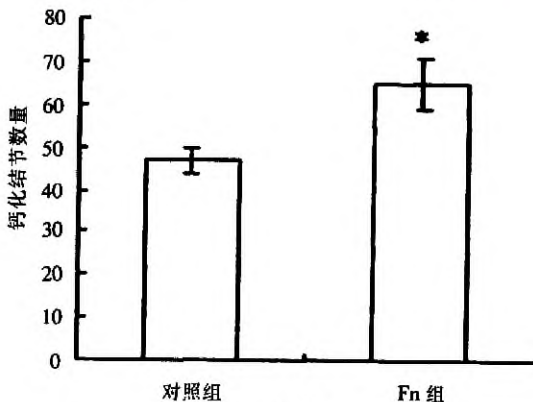


图 1C

图 1 Fn 促进 SMC 表型转化及钙化结节的形成

注:1A: 对照组 SMC 第 11 天的光镜图 (40 $\times$);1B:Fn 组 (15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)SMC 第 11 天的光镜图 (40 $\times$);1C:两组细胞培养第 14 天后,每个 6 cm^2 培养皿的 Alizarin Red S 染色后钙化结节的个数;*与对照组比较 $P < 0.05$

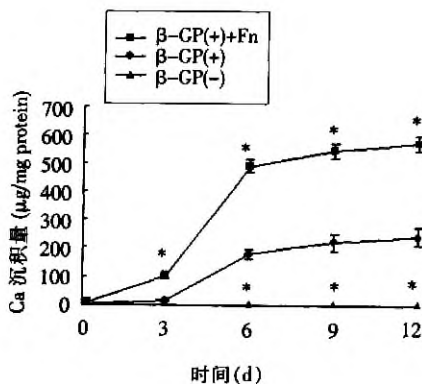


图 2A

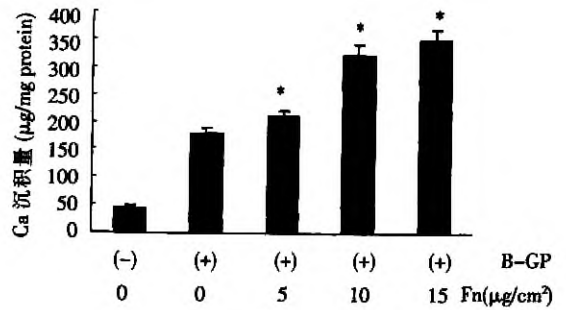


图 2B

图 2 Fn 促进血管 SMC 钙沉积的表达

注:2A: 钙沉积时间依赖性曲线 (15 $\mu\text{gFn}/\text{cm}^2$);2B: 钙沉积剂量依赖性曲线 (0~15 $\mu\text{gFn}/\text{cm}^2$);* 组间两两比较 $P < 0.05$

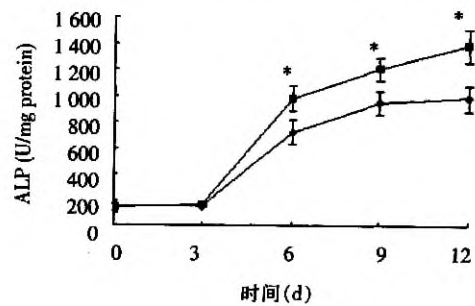


图 3A

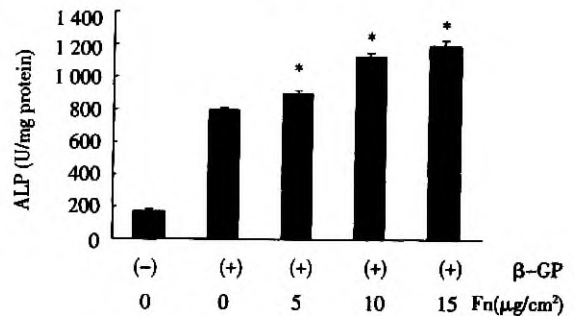


图 3B

图 3 Fn 促进血管 SMCALP 活性

注:3A:ALP 时间依赖性曲线 (15 $\mu\text{gFn}/\text{cm}^2$);3B:ALP 剂量依赖性曲线 (0~15 $\mu\text{gFn}/\text{cm}^2$);* 组间两两比较 $P < 0.05$

与分化相关基因进行了检测,检测结果表明 Fn 作用组的 SMC 的 ALP 基因表达水平明显增高 (图 4A、4B),而另两个与成骨样分化有关的 OC (图 4A、4B) 和 Cbfa-1 (图 4A-4D) 的基因表达水平也明显提高了。用免疫印迹法进行的蛋白质水平的检测显示:随着 Fn 剂量的增大,Cbfa-1 的蛋白质表达也增多,而正常 SMC 标志性蛋白 SM- α -actin 和 SM22 α 的表达呈下降趋势 (图 5A、5B)。这些实验说明 Fn 促进 SMC 钙化是由于促进了其向成骨样细胞分化所致。

2.3 Fn 通过 ERK-MAPK 信号传导通路促进 SMC 成骨样分化 蛋白免疫印迹显示,Fn 激活了 ERK1/

2.2 Fn 促进 ALP 活性和成骨样分化基因、蛋白质的表达 ALP 被认为是成骨样分化的标志之一,在血管钙化中扮演着重要的角色。在 Fn 作用下,ALP 活性被提高,并呈现剂量依赖性和时间依赖性表达 (图 3A、3B)。同时,在基因水平,我们用 RT-PCR 对

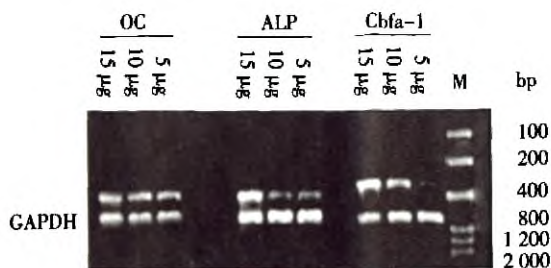


图 4A

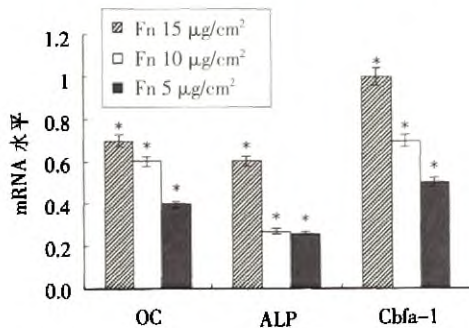


图 4B

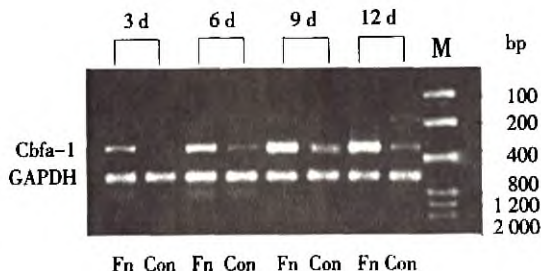


图 4C

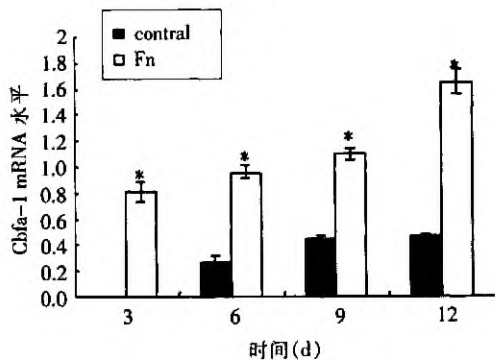


图 4D

图 4 Fn 对血管 SMC 成骨样分化基因表达的影响

注:4A:Fn 作用 2 d 后 Cbfa-1, ALP 和 OC 的表达(0~15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) GAPDH 作为内对照;4B:A 图中 mRNA 的相对表达量;4C: Cbfa-1 表达随时间的变化(15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$);4D:C 图中 mRNA 的相对表达量

2(图 6A),且 ERK 磷酸化程度与 Fn 的浓度成正相关(图 6B)。在用了 ERK 的抑制剂(PD98059)后钙化相关指标的表达均下降,包括钙化结节(图 6C)、钙沉积(图 6D)、ALP 活性(图 6E)、Cbfa-1 表达(图

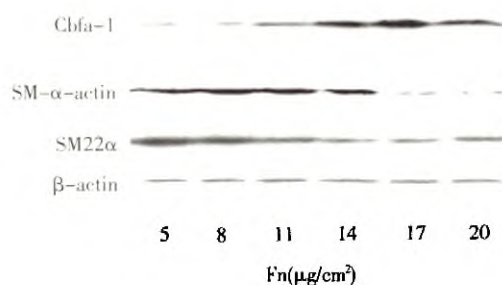


图 5A

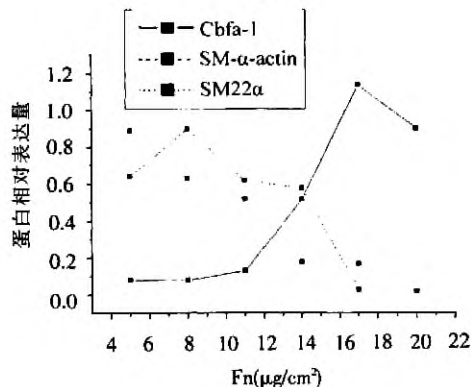


图 5B

图 5 Fn 对血管 SMC 成骨样分化蛋白表达的影响

注:5A:不同浓度 Fn 作用 5 d 后 Cbfa-1, SM-α-actin 和 SM22α 的变化,β-actin 作为内参;5B:图 A 中蛋白的相对表达量

6F)和 OC 表达(图 6G)。这说明 Fn 引发 SMC 成骨样转化的作用与丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号传导通路中 ERK 磷酸化有关。

2.4 Fn 通过细胞膜整合素受体影响 SMC 的成骨样分化 已有的研究提示:Fn 与 SMC 的相互作用主要是通过细胞膜上的整合素受体实现的。在本研究中实验结果表明,对 SMC 膜上的整合素亚单位 $\beta 1$ 进行特异性阻断使细胞 ALP 活性和钙沉积的量都明显下降(图 7A、7B)。这说明在 Fn 诱导的 SMC 分化的过程中细胞膜上的整合素是其作用的靶点,但由于整合素是由两个 α 、 β 亚基构成的异二聚体,具体哪种类型的整合素在其中发挥了作用还需要进一步的实验验证。

3 讨论

越来越多的研究者认为血管钙化是一个类似骨形成的有细胞参与的主动调节过程^[2]。目前很多研究致力于揭示这一过程的调节机制,在血管钙化的研究历史中,我们正处在一个认识飞跃时代。在这些研究中,有文献^[3,4]提出血管钙化与血管 SMC 的成骨样分化密切相关。且通过进一步的研究发现,有几个相关因子参与了这一过程的调节,而且发现相关的细胞信号传导通路参与其中的信号传导。随着研究的

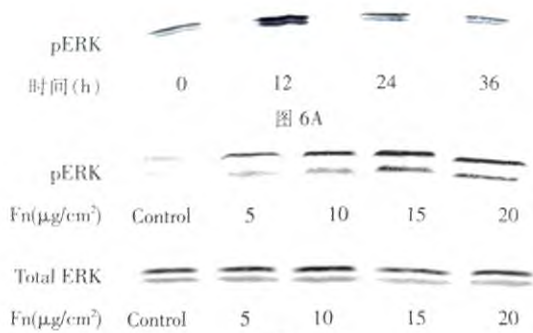


图 6B

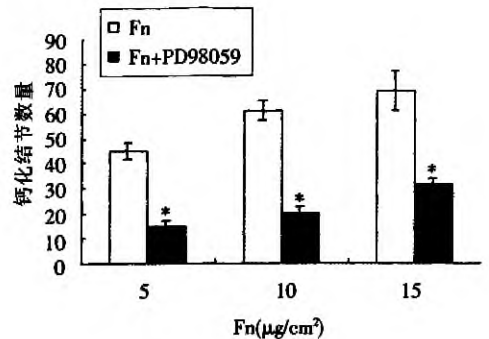


图 6C

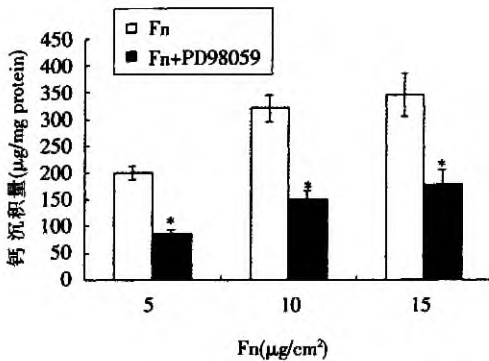


图 6D

深入, 血管基质蛋白在这一过程中的作用也得到了研究者的关注。特别是作为基质蛋白重要组成的 Fn 早已被证实参与成骨细胞的分化从而促进钙化^[5,6]。尽管 Fn 和基质 γ -羧基谷氨酸蛋白 (matrix Gla protein, MGP)、OC 等同样属于基质非胶原蛋白, 但它并没有象 MGP、OC 等蛋白那样引起研究者的关注。因为在已有的研究中, Fn 多被认为是基质中的结构蛋白。然而, 随着研究者认识到成骨样细胞在促进血管钙化中的重要作用, Fn 已有的促分化功能是否也会发挥相似的作用, 是否通过基质-细胞信号传导通路起作用。为此, 本研究通过运用一个体外 SMC 钙化模型来研究这一过程的相关机制。

研究结果显示: ①Fn 促进了 SMC 的表型转化; ②促进了与成骨样分化相关的标志物的表达, 包括: ALP、OC; ③上调了成骨样分化中起关键作用的转录

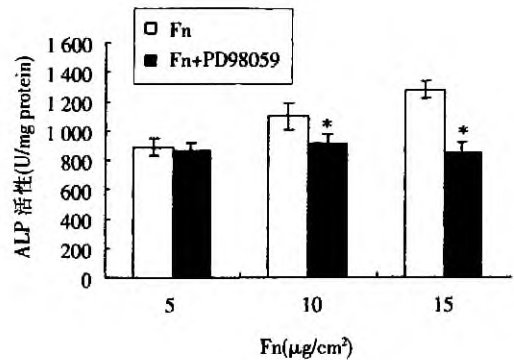


图 6E

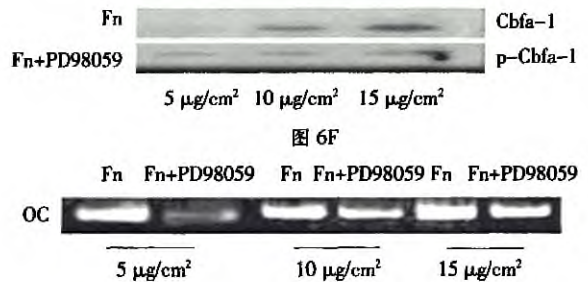


图 6G

图 6 Fn 对细胞内 ERK 信号传导通路的影响

注: 6A: 免疫印迹分析 Fn 作用后 ERK 磷酸化 (Fn 15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$); 6B: 不同浓度 Fn 对 ERK 磷酸化的影响 (Fn 0~20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$); 6C: 加入 ERK 抑制剂 PD98059 (10 μM) 后, 钙化结节数目的改变 (Fn 5~15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$); 6D: 加入 PD98059 (10 μM) 后, 钙沉积的改变 (Fn 5~15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$); 6E: 加入 PD98059 后 (10 μM) ALP 活性的改变 (Fn 5~15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$); 6F: 加入 PD98059 (10 μM) 后 p-Cbfa-1 的表达 (Fn 5~15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$); 6G: 加入 PD98059 (10 μM) 后 OC 的表达 (组间两两比较 $P < 0.05$)

因子 Cbfa-1 的表达; ④下调了 SMC 原有标志蛋白 SM- α -actin 和 SM22 α ; ⑤激活了 ERK-MAPK 信号传导通路, 用 ERK 通路抑制剂后, ALP、钙沉积、Cbfa-1 和 OC 的表达下调; ⑥整合素 β 1 受体阻断实验显示, 阻断 β 1 使 ALP 活性和钙沉积的量均下降。从而证实, Fn 可以通过促进血管 SMC 的成骨样分化来促进钙化。

首先, 在 Fn 的作用下, SMC 加速了向成骨样细胞表型转化的过程, 在这一过程中, 作为钙化指标的 ALP 和钙沉积的量明显提高了, 这说明 Fn 可以促进钙化。

其次, Fn 提高了分化相关的基因的表达, 尤其是 Cbfa-1 的表达提高具有更为显著的意义。Cbfa-1 是一个新近发现的促进成骨细胞分化的关键性的转录调节因子, 在分化过程中它扮演了管家基因的角色, 同时它调节与分化相关的其他基因 (ALP、OC 等) 的表达^[7,8]。在 2000 年, Jono 等^[9]的研究发现: 磷酸

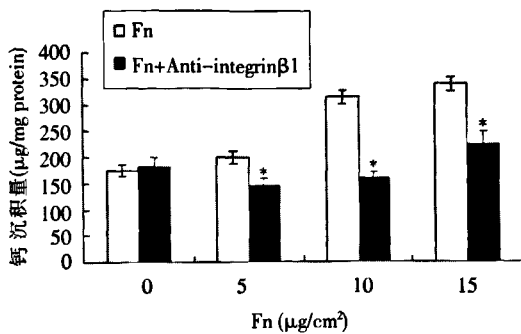


图 7A

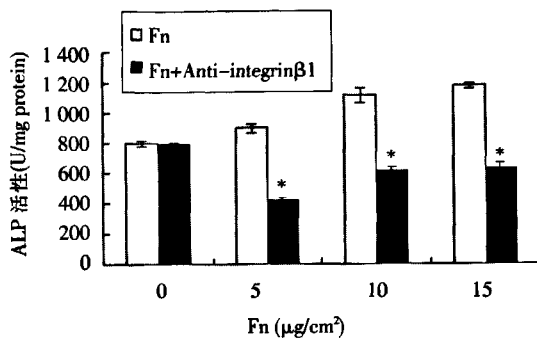


图 7B

图 7 整合素抗体阻断后钙化指标的改变

注:7A:用 Anti-integrin β1 (1 μg/ml) 作用后钙沉积的改变;7B: Anti-integrin β1 (1 μg/ml) 作用后 ALP 活性改变

盐诱导的体外平滑肌钙化过程中, Cbfa-1 的表达被上调。这说明在血管钙化的过程中 Cbfa-1 同样起着重要的调节作用。我们的研究结果显示: Cbfa-1、ALP 及 OC 的表达均提高了。结合已有的相关研究我们可以推断的是, Cbfa-1 作为转录调控因子, 它的表达提高促进了下游钙化相关基因 ALP 及 OC 的表达, 从而促进钙化。同时, 免疫印迹实验显示, 在 Fn 作用之后, SMC 原有的标志性蛋白 SM-α-actin 和 SM22α 的表达下降, 正常 SMC 为收缩样表型, 具有 SM-α-actin 和 SM22α 等与收缩功能相关的蛋白质, 而在发生了向成骨样细胞表型转化后, 其原有蛋白的表达势必下降, 本文的实验验证了这一点。

第三, 在以往的 Fn 与血管钙化的相关研究中, 信号传导通路一直没有被验证过, 有研究者曾提出整合素介导的信号传导通路可能会在其中发挥作用的观点, 但并没有相关实验的证实。而且, 作为细胞膜上的受体蛋白, 整合素在胞内引发的信号传导通路有多条途径, Fn 与之作用后引发了哪条途径的改变均在探索中。根据以往的研究结果了解到, MAPK 途径作为胞内多个信号传导途径的交汇点, 在细胞外基质与整合素作用所引起的下游事件中起着重要的作用^[10]。在间质干细胞向成骨细胞系转化的过程中, ERK-MAPK 途径是主要的信号传导通路^[11]。还

有研究^[12-14]证实, 在成骨细胞分化的过程中, ERK 磷酸化并启动了随后的 MAPK 的相关信号传导。然而, Fn 与细胞的相互作用是否通过 MAPK 途径则是一个有待回答的问题。整合素介导的 MAPK 途径是 Fn 促进细胞粘附的信号传导途径。因此, Fn 促进血管 SMC 分化有可能通过整合素-ERK-MAPK 途径。本研究实验结果显示: Fn 确实引发 ERK 磷酸化, 在使用了 ERK 传导通路抑制剂 PD98059 后, 相关的钙化指标 ALP、钙沉积、Cbfa-1 和 OC 的表达均下降, 这从另一个角度证明 Fn 确实是通过 ERK-MAPK 信号传导途径发挥作用。同时, 本研究对 SMC 膜表面的整合素受体进行的阻断实验结果表明: 阻断了 Fn 与整合素的结合后, 细胞的 ALP 活性和钙沉积均下降, 这证明整合素在这一过程中起到了与 Fn 结合并将信号由细胞外向细胞内的作用。同时, 本文对 MAPK 与 Cbfa-1 的关系也进行了研究。Xiao 等^[15]的研究结果证明, 在成骨细胞的分化过程中, MAPK 信号传导通路调控 Cbfa-1 的表达。本文 ERK 的抑制实验也表明, 抑制了 ERK 通路的相关的酶的活性后, Cbfa-1 的表达下降。这都说明 Cbfa-1 的活性依赖于 MAPK 信号传导途径, 两者之间存在着非常密切的关系, 与文献^[19]报道相一致。但是, MAPK 是否直接对 Cbfa-1 发挥作用还尚未清楚, 需要进一步实验的验证。

总之, 本文的研究结果表明: Fn 通过促进血管 SMC 向成骨样细胞分化促进钙化, 而这种作用主要是通过细胞膜表面整合素介导的细胞内 MAPK 信号传导通路发挥作用。通过这条传导通路, ERK 磷酸化提高了 Cbfa-1 的表达, 随后 Cbfa-1 作为转录调节因子促进了与钙化相关的基因的表达, 从而促进钙化。

4 参考文献

- 1 Parhami F, Morrow AD, Balucan J, et al. Lipid oxidation products have opposite effects on calcifying vascular cell and bone cell differentiation. A possible explanation for the paradox of arterial calcification in osteoporotic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, 17:680-687.
- 2 Bostrom K. Insights into the mechanism of vascular calcification. *Am J Cardiol*, 2001, 88:20E-22E.
- 3 Gadeau AP, Campan M, Millet D, et al. Osteopontin over expression is associated with arterial smooth muscle cell proliferation in vitro. *Arterioscler Thromb*, 1993, 13:120-125.
- 4 Luo G, Ducy P, McKee MD, et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature*, 1997, 386:

- 78-81.
- 5 Winnard RG, Gerstenfeld LC, Toma CD, et al. Fibronectin gene expression, synthesis and accumulation during in vitro differentiation of chicken osteoblasts. *J Bone Miner Res*, 1995, 10:1969-1977.
 - 6 Glimcher MJ. Role of collagen and phosphoproteins in the calcification of bone and other collagenous tissues. In: Rubin R, Weiss GB, Putney JW, eds. *Calcium in Biological Systems*. New York, NY: Plenum Press, 1985:607.
 - 7 Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, 2002, 108:17-29.
 - 8 Banerjee C, McCabe LR, Choi JY, et al. Runt homology domain proteins in osteoblast differentiation: AML3/CBFA1 is a major component of a bone specific complex. *J Cell Biochem*, 1997, 66:1-8.
 - 9 Jono S, McKee MD, Marry CE, et al. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res*, 2000, 87:E10-E17.
 - 10 Xiao G, Jiang D, Thomas P, et al. MAPK pathways activate and phosphorylate the osteoblast-specific transcription factor, Cbfa1. *J Biol Chem*, 2000, 275:4453-4459.
 - 11 Jaiswa RK, Jaiswal N, Bruder SP, et al. Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 2000, 275:9645-9652.
 - 12 Lai CF, Chaudhary L, Fausto A, et al. Erk is essential for growth, differentiation, integrin expression, and cell function in human osteoblastic cells. *J Biol Chem*, 2001, 276:14443-14450.
 - 13 Wang FS, Wang CJ, Sheen-Chen SM, et al. Superoxide mediates shock wave induction of ERK-dependent osteogenic transcription factor (CBFA1) and mesenchymal cell differentiation toward osteoprogenitors. *J Biol Chem*, 2002, 277:10931-10937.
 - 14 Ziros PG, Gil AP, Georgakopoulos T, et al. The bone-specific transcriptional regulator Cbfa1 is a target of mechanical signals in osteoblastic cells. *J Biol Chem*, 2002, 277:23934-23941.
 - 15 Xiao G, Jiang D, Gopalakrishnan R, et al. Fibroblast growth factor 2 induction of the osteocalcin gene requires MAPK activity and phosphorylation of the osteoblast transcription factor, Cbfa1/Runx2. *J Biol Chem*, 2002, 277:36181-36187.

(收稿日期:2009-10-27)

(本文编辑:杨军)

《实用检验医师杂志》第一届编辑委员会名单

主 编 丛玉隆

执行主编 王学谦

副 主 编 申子瑜 吕 元 尚 红 姚 智 魏 来

顾 问 王金良 王鸿利 达万明 沈 霞 张 正 金大明 周 新 胡大一 涂植光
 谌贻朴 童明庆 詹思严

编 委 马 聪 王北宁 王兰兰 王昌富 王建中 王 前 王清涛 王惠萱 王瑞琳
 毛远丽 牛瑞芳 田亚平 兰小鹏 冯关鸣 冯笑梅 曲 芬 吕时铭 吕建新
 伍严安 仲人前 任健康 刘文恩 刘运德 刘树业 刘 蕊 刘德敏 孙自镛
 孙 芾 孙 忠 苏建荣 李 山 李会强 李连青 李顺天 李 艳 李晓军
 李筱梅 吴尚为 狄 茜 辛晓敏 张伟民 张厚亮 张 峰 张 展 张 捷
 张 曼 张 鹏 陈发林 陈 伟 陈 瑜 陈 端 府伟灵 孟冬娅 郝晓柯
 胡成进 胡志东 胡丽华 段 勇 姜 傥 袁玉华 徐迎春 高 硕 黄文芳
 符生苗 康熙雄 彭 林 焦连亭 谢 风 潘柏申 魏 军 魏殿军

以上按姓氏笔画排序